



日本特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

RECEIVED
MAR 14 2001
TECH CENTER 1600/2000
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1997年 9月 8日

出願番号
Application Number:

平成 9年特許願第260972号

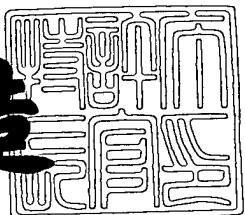
出願人
Applicant(s):

株式会社中外分子医学研究所

2001年 2月 9日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3006155

【書類名】 特許願

【整理番号】 C2-906

【提出日】 平成 9年 9月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明の名称】 トランスポーター遺伝子

【請求項の数】 12

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 153 番地2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 根津 淳一

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 153 番地2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 奥 飛鳥

【特許出願人】

【識別番号】 596102791

【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代表者】 川口 勉

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

特平 9-260972

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9710621

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トランスポーター遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：1に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項 2】 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項 3】 配列番号：3に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を含み、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項 4】 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質。

【請求項 5】 請求項1または3に記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項 6】 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 7】 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 8】 請求項5から7のいずれかに記載のDNAが挿入されたベクター。

【請求項 9】 請求項5から7のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転換体。

【請求項 10】 請求項9に記載の形質転換体を培養する工程を含む、請求項1から4のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 11】 配列番号：1に記載のタンパク質に結合する抗体。

【請求項 12】 配列番号：3 に記載のタンパク質に結合する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞外から細胞内へ、あるいは細胞内から細胞外への物質の輸送に関与するタンパク質であるトランスポーターに関する。

【0002】

【従来の技術】

栄養素や内因性物質の細胞内への取り込み機構において、生体膜に存在する多種の輸送担体（トランスポーター）の関与と、その輸送機構が最近明らかになりつつある(Tsuji, A. and Tamai, I., Pharm. Res., 13, 963-977, 1996.)。これらのトランスポーターには、輸送される物質の構造認識能が備わっており、物質を選択的に輸送するが、比較的その構造認識が広いトランスポーターの場合、本来は生体異物である医薬品などについても誤認識し、積極的に細胞内へ輸送してしまうと考えられる。基本的に薬物の生体膜透過は、その分子サイズ、脂溶性、水素結合能などの物理化学的特性に依存する単純拡散に従っており、特にイオン性薬物の場合には、非解離型分子のみがpH-分配仮説に従って生体膜を透過すると考えられていた。しかし、細胞内外の効率的な物質交換活性が必要な小腸、腎尿細管、胎盤、脳脈絡叢の上皮細胞や、肝実質細胞、血液脳関門などでは、多くの薬物は単純拡散以外の特異的機構、つまりトランスポーターによる能動的な輸送により細胞膜を透過することが明らかとなってきた(玉井郁巳、辻彰：ファルマシア、31、493-497、1995.、齋藤秀之、乾賢一：医学のあゆみ、179、393-397、1996.、玉井郁巳：薬物動態、11、642-650、1996.)。例えば、非エステル型の経口用 β -ラクタム抗生物質は生理的pHにおいては両性または負に荷電し、脂溶性は極めて低いにも関わらず、腸管からの吸収は良好であることが知られている。単離膜小胞系を用いた輸送研究により、これらの薬物の吸収過程には、刷子縁膜に局在する H^+ 駆動型ペプチドトランスポーターが関与していることが示されたようになった(Okano, T. et al., J. Biol. Chem. 261, 14130-14134, 1986.)。ペプチド輸送系は、ジあるいはトリペプチドを認識するが、テトラペプチド以上

は認識できず、ペプチドサイズについては極めて厳密であるものの、非天然のアミノ酸からなるペプチドは認識するといった比較的広い基質認識性を持つ。β-ラクタム抗生物質のペプチドトランスポーターによる輸送も、やはりこの広い基質認識性ゆえの誤認識による輸送であり、臨床的にはそれを図らずも利用していくことになる(Tsuji, A., American Chemical Society (eds. Taylor, M. D., Amidon, G. L.), Washington, D. C., 101-134, 1995.)。さらには、脂溶性の高い脂肪酸のような物質の生体膜透過においても、トランスポーターが関与している可能性が報告されている(Schaffer, J. and Lodish, H., Cell, 79, 427-436, 1994.)。

【0003】

ところで、様々なトランスポーターは各臓器、細胞が持つ生理的役割に応じて備わっているはずであり、その分布や機能には臓器特異性が期待される。従って、薬物動態に臓器選択性をもたらす手法としてトランスポーターを利用することが期待できる。すなわち、トランスポーターを利用した臓器特異的薬物デリバリー(DDS)が可能であると考えられる。また、脂溶性をあげることによる単純拡散に頼った薬物の吸収性改善は、肝臓における初回通過効果を増大させたり、臓器移行性を非特異的に増大させる可能性が高い。しかし、トランスポーターの基質特異性を利用したドラッグデザインを行うことにより、脂溶性とは無関係に薬物の吸収性を高めることも可能であると考えられる(林喜代美 他: Drug Delivery System, 11, 205-213, 1996.)。このような目的のためには、多くのトランスポーターを分子レベルで同定し、その性質についての詳細な解析を行うことが必須であるが、トランスポーターはその生化学的な取り扱いの難しさと、機能測定の複雑さから、膜生理学的な研究の多さに比較し、分子レベルでの同定が非常に遅れている。

【0004】

最近になり、外来遺伝子発現系であるアフリカツメガエル(*Xenopus*)卵母細胞を用いた発現クローニング法によりいくつかのトランスポーターのcDNAがクローニングされるようになり、構造上の類似性が存在することが明らかになってきた(Fei, Y. -J. et al., Nature, 368, 563-566, 1994.)。例えば、1994年にKoeps

ellらによって、基底膜型と推定される有機カチオントransporter OCT1が発現クローニング法によってクローニングされた(Grundemann, D. et al., *Nature*, 372, 549-552, 1994.)。その後、OCT1の配列をもとにしたホモジーコローニングによってOCT2が同定された(Okuda, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 500-507, 1996.)。OCT1とOCT2はお互いに67%という非常に高い相同性を示すが、その尿細管における分布は異なっており、OCT2は主に管腔側に局在していると考えられている(Grundemann, D. et al., *J. Biol. Chem.* 272, 10408-10413, 1997.)。両者とも腎臓に強い発現が見られるが、OCT1の場合はそれ以外にも肝臓、結腸、小腸に発現が存在するのに対し、OCT2は腎臓に特異的であり、組織分布も異なっている。さらに、腎臓に特異的な遺伝子を検索する過程で同定されたNKT(Lopez-Nieto, C. E. et al., *J. Biol. Chem.* 272, 6471-6478, 1997.)と、肝臓洞様毛細血管の膜タンパクを認識する抗体の抗原としてクローニングされたNLT(Simonson, G. D. et al., *J. Cell Sci.* 107, 1065-1072, 1994.)がともに、OCT1,OCT2に高い相同性を示すことが明らかとなり、これらは一つのファミリー(OCTファミリー)を形成しているものと考えられる。これら以外には、*Drosophila*と、*C. elegans*由来の同程度のホモジーを示す遺伝子がデータベースには登録されており(それぞれGenBank accession No.Y12400, Z83228)、やはりこのファミリーに属するものと考えられる。このようにトランスポーターについての分子レベルでの同定についてはわずかな報告例しかなく、いまだ臨床上有用な多くの未知のトランスポーターが存在していると考えられる。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なトランスポーターを提供することを課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、胎児組織に特異的、あるいはより強く発現している遺伝子(fetal gene)の中には、癌をはじめとする各種疾患に関与する遺伝子が存在するとの作業仮説のもと、サブトラクション法によって作製した胎児遺伝子(fetal gene)ライブラリーのランダムシークエンシングによるスクリーニングを行ってきた

。本発明者等はこの過程において、最近クローニングされた有機カチオントランスポーターファミリータンパクと有意な相同性を示す未知の遺伝子の存在を見いだした。本発明者等は、この遺伝子のクローニングを行い、その構造の解析を行った結果、該遺伝子が全体に渡り有機カチオントランスポーターファミリータンパク質と非常に高い相同性を有する新規なタンパク質をコードしていることを見いだした。さらに、本発明者等は、単離した遺伝子がコードするタンパク質のトランスポーター活性につき検討を行った結果、該タンパク質が実際に種々の有機カチオンのトランスポーターとして機能することを見いだした。

【0007】

即ち、本発明は、新規なトランスポーターに関し、より具体的には、

- (1) 配列番号：1に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列からなり、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、
- (2) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、
- (3) 配列番号：3に記載のアミノ酸配列、または該アミノ酸配列中の1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、若しくは付加したアミノ酸配列を含み、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、
- (4) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質、
- (5) (1) または (3) に記載のタンパク質をコードするDNA、
- (6) 配列番号：2に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA、
- (7) 配列番号：4に記載の塩基配列からなるDNAにハイブリダイズするDNAであって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質をコードするDNA、
- (8) (5) から (7) のいずれかに記載のDNAが挿入されたベクター、
- (9) (5) から (7) のいずれかに記載のDNAを発現可能に保持する形質転

換体、

(10) (9) に記載の形質転換体を培養する工程を含む、(1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質の製造方法、

(11) 配列番号：1 に記載のタンパク質に結合する抗体、

(12) 配列番号：3 に記載のタンパク質に結合する抗体、

に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】

本発明は、新規なトランスポータータンパク質に関する。本発明者等が単離した新規なヒトトランスポーターcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号：2 および配列番号：4 に示す。また、これらcDNAがコードするタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：1 および配列番号：3 に示す。本発明のトランスポータータンパク質に含まれるこれら2つのタンパク質のアミノ酸配列は全体に渡り、約72%という非常に高い相同意を示し、ともにグルコーストランスポーターなど様々なタイプのトランスポーターに存在するコンセンサス配列 [Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly]-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly]-Xaa<2>-[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala]-[Asp, Glu]-Xaa-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala]-Gly-Arg-[Arg, Lys]-Xaa<4-6>-[Gly, Ser, Thr, Ala] (Maiden, M. C. et al., Nature, 325, 641-643, 1987.)を保持していた。実際に、配列番号：1 に記載のタンパク質は、様々な有機カチオンを輸送する活性を有していた。

【0009】

本発明のトランスポータータンパク質としては、有機カチオンを輸送する活性を有すれば足り、該活性を有する限り有機カチオン以外の他の物質を輸送する活性をさらに有するものも含まれる。有機カチオンとしては、例えば、TEA、カルニチン、キニジン、ピリラミンが挙げられる。また、細胞外から細胞内へ有機カチオンを輸送する活性を有するもののみならず、細胞内から細胞外へ有機カチオンを輸送する活性を有するものも含まれる。

【0010】

本発明のトランスポータータンパク質は、遺伝子組み換え技術を利用した組換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することができる。組換えタンパク質は、例えば、後述するように本発明のタンパク質をコードするDNAで形質転換した細胞を培養することにより調製することが可能である。一方、天然のタンパク質は、当業者に周知の方法、例えば、後述の本発明の抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィーを行うことにより、本発明のタンパク質の発現の高い腎臓やHeLa S3などの癌細胞株から単離することが可能である。抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。ポリクローナル抗体であれば、例えば、本発明のタンパク質をウサギなどの小動物に免疫し血清を得て、これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。また、モノクローナル抗体であれば、本発明のタンパク質をマウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞にし、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のタンパク質に対する抗体を産生するクローニングを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。なお、得られた抗体を人体に投与する目的で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト型化抗体またはヒト抗体を用いると有効である。抗体をヒト型化する方法としては、モノクローナル抗体生産細胞から抗体遺伝子をクローニングし、その抗原決定部位を既存のヒト抗体に移植するCDR graft法などが挙げられる。また、免疫系をヒトのものに入れ換えたマウスを免疫して、通常のモノクローナル抗体と同様に直接ヒト抗体を作製することもできる。

【0011】

また、当業者であれば、公知の方法を用いて配列番号：1または3に記載のト

ransporterタンパク質中のアミノ酸の置換などを適宜行い、これと実質的に同一の機能を有するタンパク質を調製することが可能である。また、タンパク質のアミノ酸の変異は天然においても生じうる。このようにアミノ酸の置換、欠失、付加により配列番号：1または3に記載のタンパク質に対してアミノ酸配列が改変された改変体であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。当業者に公知のアミノ酸を改変する方法としては、例えば、PCRによる部位特異的変異誘発システム (GIBCO-BRL, Gaithersburg, Maryland) 、オリゴヌクレオチドによる部位特異的変異誘発法 (Kramer, W. a nd Fritz, H.J (1987) *Methods in Enzymol.*, 154:350-367) 、Kunkel法 (Methods Enzymol. 85, 2763-2766 (1988)) などが挙げられる。なお、アミノ酸の置換は、通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは6アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内である。置換、欠失、付加がなされる部位は本発明のタンパク質の活性が保持される限り特に制限はない。タンパク質のトランスポーター活性は、例えば、後述の実施例6に記載の方法により検出することが可能である。

【0012】

また、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed. 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) などを用いて、配列番号：2または4に記載のDNA配列（またはその一部）を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明のタンパク質と実質的に同一の機能を有するタンパク質を得ることも常套手段である。即ち、当業者であれば、配列番号：2または4に記載のDNA配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、有機カチオンを輸送する活性を有するタンパク質を調製することが可能であり、これらのタンパク質も本発明のタンパク質に含まれる。ハイブリダイズするDNAを他の生物から単離する場合には、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ウシなどが用いられ、特に腎臓などの組織が単離に適している。これにより単離される配列番号：1または3に記載のタンパク質と実質的に同一の機能を有するタンパク質をコードするDNAは、通常、配列番号：2または配列番号：4に記載のDNAと高い相同性を有する。高い相同性とは、配列番号：2または配列番号：4に記載のDNAと、少なくとも70%以上、好ましくは少なくとも8

0%以上、さらに好ましくは少なくとも90%以上の配列の同一性を指す。

【0013】

このようなDNAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件の例を示せば、以下の如くである。即ち、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、55°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、37°Cから55°Cで1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、37°Cで20分の洗浄を1回行う。より好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、60°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、60°Cで1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1xSSC、0.1% SDS中、50°Cで20分の洗浄を2回行う。さらに好ましい条件としては、「ExpressHyb Hybridization Solution」(CLONTECH社製)を用い、68°Cで30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68°Cで1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後、2xSSC、0.1% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、0.1xSSC、0.1% SDS中、50°Cで20分の洗浄を2回行う。

【0014】

また、本発明は、上記本発明のトランスポータータンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、cDNAでも、ゲノムDNAでもよく、また合成DNAであってもよい。本発明のDNAは、上記のように配列番号：1または3に記載のタンパク質と実質的に同一の機能を有するタンパク質を単離するために用いる他、本発明のタンパク質を組換えタンパク質として生産するために利用しうる。即ち、本発明のタンパク質をコードするDNA(例えば、配列番号：2または4に記載のDNA)を適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な細胞に導入して得た形質転換体を培養し、発現させたタンパク質を精製することにより本発明のタンパク質を組換えタンパク質として調製することが可能である。組換えタンパク質の生産に用いる細胞としては、例えば、COS細胞、CHO細胞、NIH3T3細胞などの哺乳類細胞、Sf9細胞などの昆虫細胞、酵母細胞、大腸菌(E.coli)が挙げられる。ま

た、細胞内で組換えタンパク質を発現させるためのベクターは、宿主細胞に応じて変動するが、例えば、哺乳類細胞のベクターとしてはpcDNA3 (Invitrogen社製) やpEF-BOS (Nucleic Acids.Res.1990,18(17),p5322) などが、昆虫細胞のベクターとしては「BAC-to-BAC baculovirus expression system」 (GIBCO BRL社製) などが、酵母細胞のベクターとしては「Pichia Expression Kit」 (Invitrogen社製) などが、大腸菌のベクターとしてはpGEX-5X-1 (Pharmacia社製) 、「QIA express system」 (Qiagen社製) などが挙げられる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、カチオニックリポソームDOTAP(ペーリンガーマンハイム社製)を用いた方法、エレクロポレーション法、塩化カルシウム法など用いて行うことができる。得られた形質転換体からの組換えタンパク質の精製は、常法、例えば、文献「The Qiaexpressionist handbook, Qiagen, Hilden, Germany」記載の方法を用いて行うことが可能である。

【0015】

本発明のDNAは、また、本発明のタンパク質の活性異常や発現量異常に起因する疾患に対する遺伝子治療に用いることも可能である。遺伝子治療に用いる場合には、本発明のDNAをアデノウイルスベクター（例えば、pAdexLcw）やレトロウイルスベクター（例えば、pZIPneo）などに挿入して、生体内に投与する。投与方法は、*ex vivo*法であっても、*in vivo*法であってもよい。また、アンチセンス合成DNAを生体内に直接、または上記ベクターに挿入して投与して治療を行うことも可能である。

【0016】

本発明の応用として、本発明のトランスポータータンパク質を利用した、薬物の体内吸収、体内動態の制御が挙げられる。本発明のトランスポータータンパク質の基質特異性を詳細に解析することにより、このトランスポーターによって輸送され得る薬剤のドラッグデザインが可能であり、これにより本発明のトランスポータータンパク質を介して薬物の体内吸収を高めることができると考えられる。デザインされる薬物には従来の脂溶性をあげるような修飾は不要であるため、水溶性の扱いやすい薬物が迅速かつ効率的に開発できるようになると考えられる。また開発された薬物の吸収は基本的に本発明のトランスポータータンパク質の

生体内分布に従うと考えられるため、臓器特異的な薬物の送達が可能になるかもしれない。特に本発明のトランスポータータンパク質の体内分布が、標的臓器と一致するような薬物の場合、理想的なドラッグデリバリーシステム(DDS)となるであろう。また、他のトランスポーターによる薬物の吸収を期待しているが、本発明のトランスポータータンパク質による吸収は望ましくない場合、本発明のトランスポータータンパク質の基質特異性を考慮に入れたドラッグデザインを行うことにより、他のトランスポータータンパク質に選択的な薬物の創造が行えると考えられる。本発明のトランスポータータンパク質は腎臓に存在するため、逆に本発明のトランスポータータンパク質によって体外へ排出されやすい薬物を設計することにより、腎毒性等を軽減することが可能であるかもしれない。

【0017】

また、本発明の応用として、本発明のトランスポータータンパク質そのものを標的とした薬物の開発も考えられる。栄養物質の吸収機構として、あるいは薬物や生体内代謝物の排泄機構としてのトランスポーターの重要性を考えると、その機能が損なわれること、または異常に亢進することに起因する疾患が存在する可能性が考えられる。そのような疾患に対しては、本発明のトランスポータータンパク質の機能を阻害、あるいは亢進する薬剤や、本発明のトランスポーター遺伝子の発現量や、タンパク量を調節するするような薬剤が効果的であろう。また、上記のような遺伝子治療も有効であろう。

【0018】

本発明のトランスポータータンパク質は種々の癌細胞株において発現しており、腫瘍細胞において本発明のトランスポータータンパク質が薬物を細胞内へ輸送し得る可能性がある。この場合には、本発明のトランスポータータンパク質によってより吸収されやすい抗腫瘍薬が創造できると考えられる。あるいは逆に、本発明のトランスポータータンパク質による物質の細胞外へ輸送、排出する機構が、腫瘍細胞においては抗腫瘍剤の排出として働き、腫瘍細胞が薬剤に対する抵抗性を獲得する可能性も考えられる。本発明のトランスポータータンパク質が腫瘍の薬剤耐性機構に関与しているならば、本発明のトランスポータータンパク質阻害剤は抗腫瘍効果を発揮し得るかもしれない。

【0019】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

【0020】

【実施例】

【実施例1】 サブトラクションライブラリーの作製

サブトラクションライブラリーはPCR-SelectTM cDNA Subtraction kit (CLONTECH)を用い、Luda Diatchenkoらの方法(Diatchenko, L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 6025-6030, 1996.)に基本的に従って作製した。

【0021】

まずヒト胎児肝臓由来polyA⁺ RNA及びヒト成人肝臓由来polyA⁺ RNAよりMMLV逆転写酵素を用いた標準的な方法で二本鎖cDNAを合成した。つぎにT4 DNAポリメラーゼによりこのcDNA末端を平滑化し、さらにRsaIにより切断した。胎児肝臓由来cDNA(tester)の一部を2分割し、アダプター1とアダプター2(表1)をそれぞれ別々にライゲートした。これにそれぞれ120倍量の成人肝臓由来cDNA(driver)を加え、熱変性を行ったあと68℃で8時間の1次ハイブリダイゼーションを行った。つぎにこれを熱変性せずに混合し、さらに熱変性した過剰量のdriverを加え68℃で約16時間の2次ハイブリダイゼーションを行った。これを希釈用バッファーにて希釈し、75℃で7分インキュベートし、アダプターの短い方の鎖を取り除いたものをPCRの錆型として用いた。アダプターに対応するプライマーであるPCRプライマー1(5' CTAATACGACTCACTATAGGGC 3' / 配列番号: 5)、2(5' TGTAGCGTG AAGACGACAGAA 3' / 配列番号: 6)を用いたPCRを行うことにより、両端に異なるアダプターを持ったcDNA(サブトラクトされたcDNA)のみを選択的に増幅した(サプレッションPCR)。これの一部を錆型とし、PCRプライマー1、2のさらに内側に位置するプライマーであるNested PCRプライマー1(5' TCGAGCGGCCGCCGGCAG GT 3' / 配列番号: 7)と2(5' AGGGCGTGGTGCGGAGGGCGGT 3' / 配列番号: 8)を用いたPCRを行うことにより、さらに選択性を増した生成物を得た。この生成物をQIAquick PCR Purification kit(QIAGEN)を用いて精製し、pT7Blue-Tベクター(Novagen)にTAクローニング法によりクローニングし、サブトラクションライブ

ラリーとした。

【0022】

【表1】

アダプター1 5' CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGCAGGT 3'
3' GGCCCCGTCCA 5'

アダプター2 5' TGTAGCGTGAAGACGACAGAAAGGGCGTGGTGGAGGGCGGT 3'
3' GCCTCCCGCCA 5'

【実施例2】 cDNAクローニング

fetal geneの解析を目的に、胎児肝臓由来サブトラクションライブラリーの、ランダムシーケンシングによるスクリーニングを行った。得られたEST(Expressed Sequence Tag)のホモジナーサーチ(Blastx)による解析から、既知の有機力チオントランスポーターであるOCT1(Grundemann, D. et al., *Nature*, 372, 549-552, 1994.)、OCT2(Okuda, M. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224, 500-507, 1996.)、及びそのファミリータンパク(OCTファミリータンパク)と高い相同意を示すアミノ酸配列をコードするクローニング、f1s631(292bp)が見いだされた。このクローニングの配列は新規なものであり、新規のトランスポーター遺伝子由来の断片である可能性が推測されたことから、この遺伝子の全オープンリーディングフレーム(ORF)を含むcDNAのクローニングを行った。

【0023】

胎児肝臓由来サブトラクションライブラリーより得られたf1s631オリジナルクローニングをプローブとし、human fetal liver 5'-stretch cDNA ライブラリー(CLONTECH)のスクリーニングを行った。f1s631オリジナルクローニングのインサートを、M13 P4-22とM13 P5-22を用いたPCRにより増幅し、これをReady-to Go DNA labeling beads (Pharmacia)を用いたランダムプライマー法により [α -³²P] dCTPでラベルし、プローブとした。ハイブリダイゼーションはExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH)中、68°Cで、メーカー推奨の方法に従い行った。また

、最終的な洗浄は、0.1 X SSC, 0.1% SDS、50°Cで行った。約 5×10^5 個のファージクローンをスクリーニングしたところ、最終的に7個の陽性クローンが単離された。これらのクローンのインサートcDNAを λ gt10ベクターの配列より設計したベクタープライマー(GT10 S1 5' CTTTGACCAAGTCAGCCT 3'／配列番号：9, GT10 A1 5' AGAGGTGGCTTATGAGTATTCCTT 3'／配列番号：10)、あるいは解読されたcDNAの配列より設計したプライマーを用いたPCRによって増幅し、その産物を直接シークエンシングすることにより、塩基配列を決定した。一部の増幅が困難な領域については7-deaza dGTPを基質塩基として用いたPCRによる増幅を行った(McConlogue, L. et al., Nucleic Acids Res. 16, 9869, 1988.)。

【0024】

約 5×10^5 個のファージクローンをスクリーニングしたところ、最終的に7個の陽性クローンが単離された。これらのクローンのインサートcDNAの塩基配列を決定した結果、f1s631遺伝子は、551アミノ酸（推定分子量約62,000）からなるORFをコードし得る配列を持つことが明らかとなった。この全アミノ酸配列を用いてデーターベースサーチ行ったところ、f1s631オリジナルクローンに対応する部位のみではなく、全体に渡って既知のOCTファミリータンパクと非常に高い相同性を示すことが確認された。f1s631とOCTファミリータンパク（ラットOCT1、ラットOCT2、マウスNKT(Lopez-Nieto, C. E. et al., J. Biol. Chem. 272, 6471-6478, 1997.)、ラットNLT(Simonson, G. D. et al., J. Cell Sci. 107, 1065-1072, 1994.)のアミノ酸配列との比較を図1に示す。f1s631はアミノ酸レベルでこれらのファミリータンパクと、それぞれ32%、33%、28%、28%の相同性を示した。また、Kyte & Doolittleの計算式(Kyte, J. and Doolittle, R. F., J. Mol. Biol. 157, 105-132, 1982.)によって得られる疎水性プロフィールは、OCTファミリータンパクのものと非常に類似しており、11-12個の膜貫通領域と思われる疎水性領域が認められた（図2）。また、この配列中には1個の糖トランスポーターのコンセンサス配列（[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Thr, Ala, Gly]-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Ser, Ala, Gly]-Xaa<2>-[Leu, Ile, Val, Met, Ser, Ala]-[Asp, Glu]-Xaa-[Leu, Ile, Val, Met, Phe, Tyr, Trp, Ala]-Gly-Arg-[Arg, Lys]-Xaa<4-6>-[Gly, Ser, Thr, Ala]）が存在した(160-175)。このコンセンサス配列は

、哺乳類細胞におけるグルコースのトランスポーターであるGLUT1～GLUT7に存在するコンセンサス配列であり、グルコーストランスポーター以外にも、様々なタイプのトランスポーターに存在することが知られている(Maiden, M. C. et al., *Nature*, 325, 641-643, 1987.)。f1s631のアミノ酸配列中には、さらに、N型糖鎖が付加され得る配列 (N-X-[ST]) が4箇所(57-59, 64-66, 91-93, 304-306)見られる。OCTファミリーにおいても同様にN型糖鎖による修飾の可能性が示唆されているが、生化学的な証明はなされておらず、その生物学的な意義についても不明である。また、プロテインキナーゼCによるリン酸化を受け得るサイト ([ST]-X-[RK]) も5箇所 (164-166, 225-227, 280-282, 286-288, 530-532) 存在した。これらのうち特に286-288のサイトは、全てのOCTファミリータンパクにおいて共通する位置に保存されている。さらに、ATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列([Ala, Gly]-Xaa(4)-Gly-Lys-[Ser, Thr])も存在する。このATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列はキナーゼやrasファミリータンパク等のATP結合タンパク、あるいはGTP結合タンパク質に存在し、この部位にATP, GTPが結合することが知られている(Walker, J. E. et al. *EMBO J.*, 1, 945-951, 1982)。ABC(ATP Binding Cassette)型トランスポーターと呼ばれるトランスポーターにはこの配列が存在し、ATPを加水分解することによるエネルギーを用いて物質を輸送していることが示されている(Higgins, C. F. et al., *J. Bioenerg. Biomembr.*, 22, 571-592, 1990; Urbatsch, I. L. et al., *J. Biol. Chem.*, 270, 26956-26961, 1995)。このコンセンサス配列の存在により、f1s631タンパク質がATPあるいはGTP依存的な輸送を行うトランスポーターである可能性も考えられる。

【0025】

なお、塩基配列の決定は、アルカリSDS法によって調製したプラスミドDNA、またはコロニーPCRなどによるPCR産物を鑄型とし、ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit With AmpliTaq DNA Polymerase, FSを用いたサイクルシークエンシング法により行い、ABI 377 DNA Sequencer (PerkinElmer社)により解読した。コロニーPCRは、ベクタープライマーであるM13 P4-22(5' CCAGGGTTTCCAGTCACGAC 3' /配列番号: 1 1)及びM13 P5-22(5' TCACACAGGAA ACAGCTATGAC 3' /配列番号: 1 2)を含むPCR反応溶液の中に、組み換え体を持つ

コロニーを直接懸濁することにより行った。PCR反応後、増幅されたインサートDNAから、ゲル濾過法などにより未反応のプライマー、ヌクレオチド等を除き、シーケンシングの録型として用いた。

【0026】

[実施例3] ノーザン解析

f1s631の組織分布をノーザン解析により調べた(図3)。f1s631の3'側断片(約1,100番目の塩基より後半)を、Ready-to Go DNA labelling beads (Pharmacia)を用いたランダムプライマー法により $[\alpha-32P]dCTP$ でラベルし、プローブとして用いた。Multiple Tissue Northern (MTN) Blot - Human, Human III, Human IV, Human Fetal II, Human Cell line (CLONTECH)を用い、ExpressHyb Hybridization Solution (CLONTECH)中で、メーカー推奨の方法に従い、68°Cでハイブリダイゼーションを行った。最終的な洗浄は、0.1 X SSC, 0.1% SDS、50°Cで行った。その結果、胎児では肝臓に、そして成人由来の臓器では、腎臓、骨髓、気管に約2.5kbの強い発現が観察された。それ以外には胎児の腎臓、肺、そして成人の骨格筋、肺、胎盤、前立腺、脾臓、脊髄に弱い発現が見られた。また、腫瘍細胞株においてもHeLa S3、K562、SW480、A549に発現が認められ、特にHeLa S3においては非常に強く発現していることが明らかとなった。

【0027】

[実施例4] 631RTのcDNAクローニング

f1s631の全塩基配列を用いたデータベースサーチより、ヒューマンゲノムセンターから報告されているヒト5番染色体q領域由来P1ファージクローン(P1 H24クローン。GenBank accession No.L43407, L43408, L46907, L81773, L43409)の塩基配列の一部に、f1s631の配列と非常に類似しているが、明らかに異なる配列が含まれていることを見いだした。この類似配列は、インtronと思われる配列のため分断されているが、これを連結してみると、f1s631配列と非常に高い相同意味がみられた(図4)。このことから、OCT1とOCT2の関係のような、f1s631ホモログが存在することが示唆された。そこでこのホモログのcDNAクローニングをめざし、これらのP1ファージクローンの配列より631R S4プライマー(5' GTGCTGT TGGGCTCCTTCATTCA 3' / 配列番号: 13)及び631R A1プライマー(5' AGCTGCATGA

AGAGAAGGACACTG 3' / 配列番号: 14)を作製し、ヒト成人腎臓由来polyA⁺ RNA(CLONTECH)より合成したcDNAを鑄型に、94℃で3分、(94℃で30秒、58℃で1分、72℃で2分)を35サイクル、72℃で10分という条件によるPCRを行ったところ、約90bpの断片が増幅された。この断片をpT7Blue-Tベクター(Novagen)にTAクローニング法によりサブクローニングし、塩基配列を決定したところ、全体に渡りf1s631と非常に高い相同意を有することが明らかとなった。そこでこの遺伝子を631RT(f1s631 Related Transporter)と命名し、さらに長いcDNAのクローニングを行った。

【0028】

新たに631R S6プライマー(5' AGCATCCTGTCTCCCTACTTCGTT 3' / 配列番号: 15)を作製し、ヒト成人腎臓由来Marathon-ReadyTM cDNA(CLONTECH)を鑄型として、94℃で2分、(94℃で30秒、60℃で1分、72℃で3分)を35サイクル、72℃で10分という条件のPCRで、RACE(Rapid Amplification of cDNA Ends)法(Chenchik, A., Moqadam, F., and Siebert, P. (1995) CLONTECHniques X, 5-8)によるクローニングを試みた。その結果、約1.7kbpの断片が増幅され、これをpT7Blue-TベクターにTAクローニング法によりサブクローニングした。このクローンの塩基配列を一部決定したところ、これは631RTの3'側断片であることが明らかとなった。以上的方法で得られた配列を連結したものを配列番号: 3に示す。

【0029】

この配列中には460アミノ酸からなるORFがコードされていた。このORFの配列と、f1s631のアミノ酸配列の比較を図5に示す。両者は全体に渡り、約72%という非常に高い相同意を示した。また631RTアミノ酸配列中にはf1s631と同様に1個の糖トランスポーターのコンセンサス配列が存在した。これらのことより、631RTはf1s631と構造上の関連を持った新規トランスポーターである可能性が示唆された。また、631RTアミノ酸配列中にも、f1s631と同様にATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列が存在した。さらに長い領域を含む631RT cDNAは、すでに得られているcDNAをプローブとして、f1s631 cDNAのクローニングと同様な方法で行うことができると考えられる。

【0030】

[実施例 5] ノーザン解析

631R S4プライマー(5' GTGCTGTTGGGCTCCTTCATTTCA 3' / 配列番号: 13)及び631R A1プライマー(5' AGCTGCATGAAGAGAAGGACACTG 3' / 配列番号: 14)を用いたPCRによって得られた約900bpの631RT cDNAをプローブとし、f1s631と同様にノーザン解析を行った。その結果を図6に示す。発現パターンはf1s631のパターンと重複している部分があるが、胎児組織において腎臓に非常に強い発現が見られる点が特に異なっていた。また、631RTもまたK-562, HeLaS3, SW480等の癌細胞株で強く発現していることが判明した。これらの癌細胞において、f1s631, 631RTが抗癌剤などの物質の輸送に関与している可能性が示唆される。

【0031】

[実施例 6] f1s631のヒト胎児腎臓細胞(HEK293)での強制発現と活性測定

プラークハイブリダイゼーションによるスクリーニングによって得られた陽性ファージクローンより、QIAGEN Lambda Kit(QIAGEN)を用いてファージDNAを抽出した。インサートDNAをpUC18ベクターにサブクローニングした後、SmaI及びEcoRIで切り出される全ORFを含むcDNAを、哺乳類細胞用の発現ベクターであるpcDNA3(Invitrogen)のEcoRIサイトと、平滑末端化したHindIIIサイトとの間へ組み込み、発現用プラスミドDNA、「pcDNA3/631-2」を得た。プラスミドDNAは、QIAGEN PLASMID MAXI Kit(QIAGEN)を用いたアルカリ-SDS法で調製した。

【0032】

pcDNA3/631-2、及びコントロールとしてインサートを含まないpcDNA3ベクターを、リン酸カルシウム法によりヒト胎児腎臓由来細胞株HEK293細胞に導入した。すなわち、プラスミドDNA10 μg、Hepes緩衝液(137mM NaCl, 5mM KCl, 0.7mM Na₂HP0₄, 6mM Dextrose, 21mM Hepes pH7.1)1ml、2M CaCl₂ 62.5 μlを混合し、30分以上室温で静置することによりリン酸カルシウム共沈物を生成させた。10cmプレート1枚あたり1.5 × 10⁶個の細胞を蒔き、24時間培養した後、先のリン酸カルシウム共沈物を加え24時間培養し、その後PBS(Phosphate buffered saline)でプレートを洗浄し、培地を加えさらに24時間培養した。

【0033】

プラスミドDNAを導入した細胞、あるいは未処理の細胞を用いて以下の手順に

従ってトランスポート実験を行った。プレートからラバーポリスマンを用いて細胞をはがし、トランスポート緩衝液(125mM NaCl, 4.8mM KCl, 5.6mM (+)-glucose, 1.2mM CaCl₂, 1.2mM KH₂PO₄, 1.2mM MgSO₄, 25mM Hepes pH7.4)に懸濁し、20分間プレインキュベーションを行った。ついで各種基質のラベル体([¹⁴C] TEA<テトラエチルアンモニウム>(NEN)、[³H]カルニチン<L-カルニチン ヒドロクロリド>(Amersham)、[³H] PCG<ベンジル ペニシリン>(Amersham)、[³H]キニジン(ARC)、[³H]ピリラミン<メピラミン>(Amersham))を適当量添加し、37°Cにて一定時間インキュベートを行った。これを、3M KCl層の上にシリコンオイルと液体パラフィンの混合物(比重=1.022)を重層して作製したシリコンレイヤー上に重層し、遠心することにより細胞を分離した。細胞の放射活性を測定し、細胞内へのトランスポート能とした。なおこの際、 1×10^6 個の細胞を1ポイントとして用いた。また、HEK293細胞の培養は、ダルベッコMEM、10% FCS(ウシ胎児血清)を培地とし、5%二酸化炭素中、37°Cで行った。

【0034】

まず、TEAを基質として用い、pcDNA3/f1s631-2を導入した細胞と、未処理の細胞におけるトランスポーター能を測定した(図7)。その結果、反応時間に依存した明らかなf1s631導入細胞内へのTEAの取り込みが観察された。この取り込みは、未処理細胞においては見られなかった。次に、この系にラベル体ではないTEAを添加することによるコールドインヒビションの実験を行った(図8)。加えるコールドのTEAの濃度に応じて明らかな見かけ上の取り込みの低下が観察された。この実験においてはインサートを含まないpcDNA3ベクターを導入した細胞(Mock)をコントロールとしたが、未処理の細胞を用いた場合と同様に、ほとんど細胞内への基質の取り込みは認められず、この取り込み現象がf1s631を導入したことによることが明らかとなった。次に、f1s631のTEAに対するK_m(ミカエリス定数)値を求めるために、様々な濃度の[¹⁴C] TEAを加えた場合の取り込み量を測定した(図9)。f1s631を導入した細胞における取り込み量からMockの取り込み量を差し引いた正味の取り込み量をLineweaver-Burk逆数プロットすることにより、K_m値は0.44±0.04mMであることが求められた。また反応の最大速度V_{max}は6.68±0.34(nmol/3 min/mg)であることが求められた。次に、TEA以外の物質に対する

輸送能を検討した(図10)。有機カチオンであるカルニチン、キニジン、ピリラミンのラベル体を用い輸送能を測定したところ、Mockに対し明らかに有意な取り込み量の増加が観察され、これらの有機カチオンはf1s631の基質になりうることが明らかとなった。しかし、有機アニオンであるPCG(ベンジルペニシリン)に対しては取り込み量の有意な増加は認めらなかった。

【0035】

【発明の効果】

本発明により、有機カチオンを輸送する新規なトランスポーターが提供された。本発明のトランスポーターは、これを介して輸送される新規なデザインの薬物の開発や、その機能異常などに起因する疾患の治療薬の開発などに有用である。

【0036】

【配列表】

配列番号 : 1

配列の長さ : 551

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配 列

			Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala		
		1	5		
Phe	Leu	Gly	Glu Trp Gly Pro Phe Gln Arg Leu Ile Phe Phe Leu Leu		
10		15	20	25	
Ser	Ala	Ser	Ile Ile Pro Asn Gly Phe Asn Gly Met Ser Val Val Phe		
		30	35	40	
Leu	Ala	Gly	Thr Pro Glu His Arg Cys Arg Val Pro Asp Ala Ala Asn		
		45	50	55	
Leu	Ser	Ser	Ala Trp Arg Asn Asn Ser Val Pro Leu Arg Leu Arg Asp		
		60	65	70	
Gly	Arg	Glu	Val Pro His Ser Cys Ser Arg Tyr Arg Leu Ala Thr Ile		
		75	80	85	
Ala	Asn	Phe	Ser Ala Leu Gly Leu Glu Pro Gly Arg Asp Val Asp Leu		
		90	95	100	105
Gly	Gln	Leu	Glu Gln Glu Ser Cys Leu Asp Gly Trp Glu Phe Ser Gln		
		110	115	120	
Asp	Val	Tyr	Leu Ser Thr Val Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu		
		125	130	135	
Asp	Asn	Trp	Lys Val Pro Leu Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val		
		140	145	150	
Leu	Leu	Gly	Ser Phe Val Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg		

155	160	165
Lys Asn Val Leu Phe Ala Thr Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe		
170	175	180
Leu Gln Ile Phe Ser Ile Ser Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val		
190	195	200
Ile Val Gly Met Gly Gln Ile Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu		
205	210	215
Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu		
220	225	230
Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala Val Gly Tyr Met Leu Leu Pro Leu Phe		
235	240	245
Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val		
250	255	260
Pro Gly Val Leu Cys Val Pro Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro		
270	275	280
Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg Arg Phe Arg Glu Ala Glu Asp Ile Ile		
285	290	295
Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn Asn Thr Ala Val Pro Ala Val Ile Phe		
300	305	310
Asp Ser Val Glu Glu Leu Asn Pro Leu Lys Gln Gln Lys Ala Phe Ile		
315	320	325
Leu Asp Leu Phe Arg Thr Arg Asn Ile Ala Ile Met Thr Ile Met Ser		
330	335	340
Leu Leu Leu Trp Met Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu		
350	355	360
Asp Ala Pro Asn Leu His Gly Asp Ala Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser		
365	370	375
Ala Leu Ile Glu Ile Pro Ala Tyr Ile Thr Ala Trp Leu Leu Leu Arg		
380	385	390

Thr Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ala Val Leu Phe Trp Gly Gly
 395 400 405
 Gly Val Leu Leu Phe Ile Gln Leu Val Pro Val Asp Tyr Tyr Phe Leu
 410 415 420 425
 Ser Ile Gly Leu Val Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe
 430 435 440
 Ser Met Leu Tyr Val Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg
 445 450 455
 Asn Met Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile
 460 465 470
 Ile Ala Pro Tyr Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Met Leu Pro
 475 480 485
 Tyr Ile Val Met Gly Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Phe Thr Leu
 490 495 500 505
 Phe Phe Pro Glu Ser Leu Gly Met Thr Leu Pro Glu Thr Leu Glu Gln
 510 515 520
 Met Gln Lys Val Lys Trp Phe Arg Ser Gly Lys Lys Thr Arg Asp Ser
 525 530 535
 Met Glu Thr Glu Glu Asn Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe
 540 545 550

配列番号 : 2

配列の長さ : 2135

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配列の特徴

特徴を表す記号 : CDS

存在位置 : 147.. 1799

特徴を決定した方法 : E

配 列

CCCCGGCTTC	GCGCCCCAAT	TTCTAACAGC	CTGCCGTGCC	CCCGGGAACG	TTCTAACATC	60										
CTTGGGGAGC	GCCCCAGCTA	CAAGACACTG	TCCTGAGAAC	GCTGTCATCA	CCCGTAGTTG	120										
CAAGTTTCGG	AGCGGCAGTG	GGAAGC	ATG CGG	GAC TAC	GAC GAG GTG	ATC GCC	173									
Met Arg Asp Tyr Asp Glu Val Ile Ala																
		1		5												
TTC	CTG GGC	GAG TGG	GGG CCC	TTC CAG	CGC CTC	ATC TTC	TTC CTG CTC	221								
Phe	Leu	Gly	Glu	Trp	Gly	Pro	Phe	Gln	Arg	Leu	Ile	Phe	Phe	Leu	Leu	
10				15				20			25					
AGC	GCC	AGC	ATC	ATC	CCC	AAT	GGC	TTC	AAT	GGT	ATG	TCA	GTC	GTG	TTC	269
Ser	Ala	Ser	Ile	Ile	Pro	Asn	Gly	Phe	Asn	Gly	Met	Ser	Val	Val	Phe	
					30				35			40				
CTG	GCG	GGG	ACC	CCG	GAG	CAC	CGC	TGT	CGA	GTG	CCG	GAC	GCC	GCG	AAC	317
Leu	Ala	Gly	Thr	Pro	Glu	His	Arg	Cys	Arg	Val	Pro	Asp	Ala	Ala	Asn	
					45				50			55				
CTG	AGC	AGC	GCC	TGG	CGC	AAC	AAC	AGT	GTC	CCG	CTG	CGG	CTG	CGG	GAC	365
Leu	Ser	Ser	Ala	Trp	Arg	Asn	Asn	Ser	Val	Pro	Leu	Arg	Leu	Arg	Asp	
					60				65			70				
GGC	CGC	GAG	GTG	CCC	CAC	AGC	TGC	AGC	CGC	TAC	CGG	CTC	GCC	ACC	ATC	413
Gly	Arg	Glu	Val	Pro	His	Ser	Cys	Ser	Arg	Tyr	Arg	Leu	Ala	Thr	Ile	
					75				80			85				
GCC	AAC	TTC	TCG	GCG	CTC	GGG	CTG	GAG	CCG	GGG	CGC	GAC	GTG	GAC	CTG	461
Ala	Asn	Phe	Ser	Ala	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	
					90				95			100			105	
GGG	CAG	CTG	GAG	CAG	GAG	AGC	TGC	CTG	GAT	GGC	TGG	GAG	TTC	AGC	CAG	509
Gly	Gln	Leu	Glu	Gln	Glu	Ser	Cys	Leu	Asp	Gly	Trp	Glu	Phe	Ser	Gln	
									110			115			120	

GAC GTC TAC CTG TCC ACC GTC GTG ACC GAG TGG AAT CTG GTG TGT GAG 557
 Asp Val Tyr Leu Ser Thr Val Val Thr Glu Trp Asn Leu Val Cys Glu
 125 130 135
 GAC AAC TGG AAG GTG CCC CTC ACC ACC TCC CTG TTC TTC GTA GGC GTG 605
 Asp Asn Trp Lys Val Pro Leu Thr Thr Ser Leu Phe Phe Val Gly Val
 140 145 150
 CTC CTC GGC TCC TTC GTG TCC GGG CAG CTG TCA GAC AGG TTT GGC AGG 653
 Leu Leu Gly Ser Phe Val Ser Gly Gln Leu Ser Asp Arg Phe Gly Arg
 155 160 165
 AAG AAC GTT CTC TTC GCA ACC ATG GCT GTA CAG ACT GGC TTC AGC TTC 701
 Lys Asn Val Leu Phe Ala Thr Met Ala Val Gln Thr Gly Phe Ser Phe
 170 175 180 185
 CTG CAG ATT TTC TCC ATC AGC TGG GAG ATG TTC ACT GTG TTA TTT GTC 749
 Leu Gln Ile Phe Ser Ile Ser Trp Glu Met Phe Thr Val Leu Phe Val
 190 195 200
 ATC GTG GGC ATG GGC CAG ATC TCC AAC TAT GTG GTA GCC TTC ATA CTA 797
 Ile Val Gly Met Gly Gln Ile Ser Asn Tyr Val Val Ala Phe Ile Leu
 205 210 215
 GGA ACA GAA ATT CTT GGC AAG TCA GTT CGT ATT ATA TTC TCT ACA TTA 845
 Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu
 220 225 230
 GGA GTG TGC ACA TTT TTT GCA GTT GGC TAT ATG CTG CTG CCA CTG TTT 893
 Gly Val Cys Thr Phe Phe Ala Val Gly Tyr Met Leu Leu Pro Leu Phe
 235 240 245
 GCT TAC TTC ATC AGA GAC TGG CGG ATG CTG CTG CTG GCG CTG ACG GTG 941
 Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp Arg Met Leu Leu Leu Ala Leu Thr Val
 250 255 260 265
 CCG GGA GTG CTG TGT GTC CCG CTG TGG TGG TTC ATT CCT GAA TCT CCC 989
 Pro Gly Val Leu Cys Val Pro Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Ser Pro

270	275	280	
CGA TGG CTG ATA TCC CAG AGA AGA TTT AGA GAG GCT GAA GAT ATC ATC			1037
Arg Trp Leu Ile Ser Gln Arg Arg Phe Arg Glu Ala Glu Asp Ile Ile			
285	290	295	
CAA AAA GCT GCA AAA ATG AAC AAC ACA GCT GTA CCA GCA GTG ATA TTT			1085
Gln Lys Ala Ala Lys Met Asn Asn Thr Ala Val Pro Ala Val Ile Phe			
300	305	310	
GAT TCT GTG GAG GAG CTA AAT CCC CTG AAG CAG CAG AAA GCT TTC ATT			1133
Asp Ser Val Glu Glu Leu Asn Pro Leu Lys Gln Gln Lys Ala Phe Ile			
315	320	325	
CTG GAC CTG TTC AGG ACT CGG AAT ATT GCC ATA ATG ACC ATT ATG TCT			1181
Leu Asp Leu Phe Arg Thr Arg Asn Ile Ala Ile Met Thr Ile Met Ser			
330	335	340	345
TTG CTG CTA TGG ATG CTG ACC TCA GTG GGT TAC TTT GCT CTG TCT CTG			1229
Leu Leu Leu Trp Met Leu Thr Ser Val Gly Tyr Phe Ala Leu Ser Leu			
350	355	360	
GAT GCT CCT AAT TTA CAT GGA GAT GCC TAC CTG AAC TGT TTC CTC TCT			1277
Asp Ala Pro Asn Leu His Gly Asp Ala Tyr Leu Asn Cys Phe Leu Ser			
365	370	375	
GCC TTG ATT GAA ATT CCA GCT TAC ATT ACA GCC TGG CTG CTA TTG CGA			1325
Ala Leu Ile Glu Ile Pro Ala Tyr Ile Thr Ala Trp Leu Leu Arg			
380	385	390	
ACG CTG CCC AGG CGT TAT ATC ATA GCT GCA GTA CTG TTC TGG GGA GGA			1373
Thr Leu Pro Arg Arg Tyr Ile Ile Ala Ala Val Leu Phe Trp Gly Gly			
395	400	405	
GGT GTG CTT CTC TTC ATT CAA CTG GTA CCT GTG GAT TAT TAC TTC TTA			1421
Gly Val Leu Leu Phe Ile Gln Leu Val Pro Val Asp Tyr Tyr Phe Leu			
410	415	420	425
TCC ATT GGT CTG GTC ATG CTG GGA AAA TTT GGG ATC ACC TCT GCT TTC			1469

Ser Ile Gly Leu Val Met Leu Gly Lys Phe Gly Ile Thr Ser Ala Phe
 430 435 440
 TCC ATG CTG TAT GTC TTC ACT GCT GAG CTC TAC CCA ACC CTG GTC AGG 1517
 Ser Met Leu Tyr Val Phe Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Leu Val Arg
 445 450 455
 AAC ATG GCG GTG GGG GTC ACA TCC ACG GCC TCC AGA GTG GGC AGC ATC 1565
 Asn Met Ala Val Gly Val Thr Ser Thr Ala Ser Arg Val Gly Ser Ile
 460 465 470
 ATT GCC CCC TAC TTT GTT TAC CTC GGT GCT TAC AAC AGA ATG CTG CCC 1613
 Ile Ala Pro Tyr Phe Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asn Arg Met Leu Pro
 475 480 485
 TAC ATC GTC ATG GGT AGT CTG ACT GTC CTG ATT GGA ATC TTC ACC CTT 1661
 Tyr Ile Val Met Gly Ser Leu Thr Val Leu Ile Gly Ile Phe Thr Leu
 490 495 500 505
 TTT TTC CCT GAA AGT TTG GGA ATG ACT CTT CCA GAA ACC TTA GAG CAG 1709
 Phe Phe Pro Glu Ser Leu Gly Met Thr Leu Pro Glu Thr Leu Glu Gln
 510 515 520
 ATG CAG AAA GTG AAA TGG TTC AGA TCT GGG AAA AAA ACA AGA GAC TCA 1757
 Met Gln Lys Val Lys Trp Phe Arg Ser Gly Lys Lys Thr Arg Asp Ser
 525 530 535
 ATG GAG ACA GAA GAA AAT CCC AAG GTT CTA ATA ACT GCA TTC 1799
 Met Glu Thr Glu Glu Asn Pro Lys Val Leu Ile Thr Ala Phe
 540 545 550
 TGAAAAAAATA TCTACCCCAT TTGGTGAAGT GAAAAACAGA AAAATAAGAC CCTGTGGAGA 1859
 AATTCTGTTGT TCCCCACTGAA ATGGACTGAC TGTAAACGATT GACACCAAAA TGAACCTTGC 1919
 TATCAAGAAA TGCTCGTCAT ACAGTAAACT CTGGATGATT CTTCCAGATA ATGTCCTTGC 1979
 TTTACAAACC AACCATTTCT AGAGAGTCTC CTTACTCATT AATTCAATGA AATGGATTGG 2039
 TAAGATGTCT TGAAAACATG TTAGTCAAGG ACTGGTAAAA TACATATAAA GATTAACACT 2099
 CATTCCAAT CATAACAAATA CTATCCAAT AAAAAT 2135

配列番号 : 3

配列の長さ : 460

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配 列

Glu	Pro	Gly	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Gly	Gln	Leu	Glu	Gln	Glu	Ser	
1															
Cys	Leu	Asp	Gly	Trp	Glu	Phe	Ser	Gln	Asp	Val	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ile
Val	Thr	Glu	Trp	Asn	Leu	Val	Cys	Glu	Asp	Asp	Trp	Lys	Ala	Pro	Leu
Thr	Ile	Ser	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Val	Leu	Leu	Gly	Ser	Phe	Ile	Ser
Gly	Gln	Leu	Ser	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Lys	Asn	Val	Leu	Phe	Val	Thr
Met	Gly	Thr	Gln	Thr	Gly	Phe	Ser	Phe	Leu	Gln	Ile	Phe	Ser	Lys	Asn
Phe	Glu	Met	Phe	Val	Val	Leu	Phe	Val	Leu	Val	Gly	Met	Gly	Gln	Ile
Ser	Asn	Tyr	Val	Ala	Ala	Phe	Val	Leu	Gly	Thr	Glu	Ile	Leu	Gly	Lys
115															
120															
125															
Ser	Val	Arg	Ile	Ile	Phe	Ser	Thr	Leu	Gly	Val	Cys	Ile	Phe	Tyr	Ala
130															
135															
140															
Phe	Gly	Tyr	Met	Val	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala	Tyr	Phe	Ile	Arg	Asp	Trp
145															
150															
155															
Arg	Met	Leu	Leu	Val	Ala	Leu	Thr	Met	Pro	Gly	Val	Leu	Cys	Val	Ala
160															
165															
170															
175															
Leu	Trp	Trp	Phe	Ile	Pro	Glu	Thr	Pro	Arg	Trp	Leu	Ile	Ser	Gln	Gly

180	185	190
Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala Asn		
195	200	205
Gly Val Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp		
210	215	220
Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu Arg		
225	230	235
Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp Met		
240	245	250
Thr Leu Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu		
260	265	270
His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu Val		
275	280	285
Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg		
290	295	300
Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe		
305	310	315
Met Gln Leu Val Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu Val		
320	325	330
Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr Val		
340	345	350
Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly		
355	360	365
Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe		
370	375	380
Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly		
385	390	395
Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu Ser		
400	405	410
415		

Phe	Gly	Thr	Pro	Leu	Pro	Asp	Thr	Ile	Asp	Gln	Met	Leu	Arg	Val	Lys
420															
Gly	Met	Lys	His	Arg	Lys	Thr	Pro	Ser	His	Thr	Arg	Met	Leu	Lys	Asp
435															
Gly	Gln	Glu	Arg	Pro	Thr	Ile	Leu	Lys	Ser	Thr	Ala	Phe			
450															

配列番号 : 4

配列の長さ : 1555

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

配 列

TG	GAG	CCG	GGG	CGC	GAC	GTG	GAC	CTG	GGG	CAG	CTG	GAG	CAG	GAG	AGC	47
Glu	Pro	Gly	Arg	Asp	Val	Asp	Leu	Gly	Gln	Leu	Glu	Gln	Glu	Ser		
1																
TGT	CTG	GAT	GGC	TGG	GAG	TTC	AGT	CAG	GAC	GTC	TAC	CTG	TCC	ACC	ATT	95
Cys	Leu	Asp	Gly	Trp	Glu	Phe	Ser	Gln	Asp	Val	Tyr	Leu	Ser	Thr	Ile	
20																
GTG	ACC	GAG	TGG	AAC	CTG	GTG	TGT	GAG	GAC	GAC	TGG	AAG	GCC	CCA	CTC	143
Val	Thr	Glu	Trp	Asn	Leu	Val	Cys	Glu	Asp	Asp	Trp	Lys	Ala	Pro	Leu	
35																
ACA	ATC	TCC	TTG	TTC	TTC	GTG	GGT	GTG	CTG	TTG	GGC	TCC	TTC	ATT	TCA	191
Thr	Ile	Ser	Leu	Phe	Phe	Val	Gly	Val	Leu	Leu	Gly	Ser	Phe	Ile	Ser	
50																
GGG	CAG	CTG	TCA	GAC	AGG	TTT	GGC	CGG	AAG	AAT	GTG	CTG	TTC	GTG	ACC	239
Gly	Gln	Leu	Ser	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Lys	Asn	Val	Leu	Phe	Val	Thr	
65																

ATG GGC ACG CAG ACA GGC TTC AGC TTC CTG CAG ATC TTC TCG AAG AAT	287
Met Gly Thr Gln Thr Gly Phe Ser Phe Leu Gln Ile Phe Ser Lys Asn	
80 85 90 95	
TTT GAG ATG TTT GTC GTG CTG TTT GTC CTT GTC GGC ATG GGC CAG ATC	335
Phe Glu Met Phe Val Val Leu Phe Val Leu Val Gly Met Gly Gln Ile	
100 105 110	
TCC AAC TAT GTG GCA GCA TTT GTC CTG GGG ACA GAA ATT CTT GGC AAG	383
Ser Asn Tyr Val Ala Ala Phe Val Leu Gly Thr Glu Ile Leu Gly Lys	
115 120 125	
TCA GTT CGT ATA ATA TTC TCT ACG TTA GGA GTG TGC ATA TTT TAT GCA	431
Ser Val Arg Ile Ile Phe Ser Thr Leu Gly Val Cys Ile Phe Tyr Ala	
130 135 140	
TTT GGC TAC ATG GTG CTG CCA CTG TTT GCT TAC TTC ATC CGA GAC TGG	479
Phe Gly Tyr Met Val Leu Pro Leu Phe Ala Tyr Phe Ile Arg Asp Trp	
145 150 155	
CGG ATG CTG CTG GTG GCG CTG ACG ATG CCG GGG GTG CTG TGC GTG GCA	527
Arg Met Leu Leu Val Ala Leu Thr Met Pro Gly Val Leu Cys Val Ala	
160 165 170 175	
CTC TGG TGG TTC ATC CCT GAG ACC CCC CGA TGG CTC ATC TCT CAG GGA	575
Leu Trp Trp Phe Ile Pro Glu Thr Pro Arg Trp Leu Ile Ser Gln Gly	
180 185 190	
CGA TTT GAA GAG GCA GAG GTG ATC ATC CGC AAG GCT GCC AAA GCC AAT	623
Arg Phe Glu Glu Ala Glu Val Ile Ile Arg Lys Ala Ala Lys Ala Asn	
195 200 205	
GGG GTT GTT GTG CCT TCC ACT ATC TTT GAC CCG AGT GAG TTA CAA GAC	671
Gly Val Val Val Pro Ser Thr Ile Phe Asp Pro Ser Glu Leu Gln Asp	
210 215 220	
CTA AGT TCC AAG AAG CAG CAG TCC CAC AAC ATT CTG GAT CTG CTT CGA	719
Leu Ser Ser Lys Lys Gln Gln Ser His Asn Ile Leu Asp Leu Leu Arg	

225	230	235	
ACC TGG AAT ATC CGG ATG GTC ACC ATC ATG TCC ATA ATG CTG TGG ATG			767
Thr Trp Asn Ile Arg Met Val Thr Ile Met Ser Ile Met Leu Trp Met			
240	245	250	255
ACC TTA TCA GTG GGC TAT TTT GGG CTT TCG CTT GAT ACT CCT AAC TTG			815
Thr Leu Ser Val Gly Tyr Phe Gly Leu Ser Leu Asp Thr Pro Asn Leu			
260	265	270	
CAT GGG GAC ATC TTT GTG AAC TGC TTC CTT TCA GCG ATG GTT GAA GTC			863
His Gly Asp Ile Phe Val Asn Cys Phe Leu Ser Ala Met Val Glu Val			
275	280	285	
CCA GCA TAT GTG TTG GCC TGG CTG CTG CTG CAA TAT TTG CCC CGG CGC			911
Pro Ala Tyr Val Leu Ala Trp Leu Leu Leu Gln Tyr Leu Pro Arg Arg			
290	295	300	
TAT TCC ATG GCC ACT GCC CTC TTC CTG GGT GGC AGT GTC CTT CTC TTC			959
Tyr Ser Met Ala Thr Ala Leu Phe Leu Gly Gly Ser Val Leu Leu Phe			
305	310	315	
ATG CAG CTG GTA CCC GTG GAC TTG TAT TAT TTG GCT ACA GTC CTG GTG			1007
Met Gln Leu Val Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Ala Thr Val Leu Val			
320	325	330	335
ATG GTG GGC AAG TTT GGA GTC ACG GCT GCC TTT TCC ATG GTC TAC GTG			1055
Met Val Gly Lys Phe Gly Val Thr Ala Ala Phe Ser Met Val Tyr Val			
340	345	350	
TAC ACA GCC GAG CTG TAT CCC ACA GTG GTG AGA AAC ATG GGT GTG GGA			1103
Tyr Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Thr Val Val Arg Asn Met Gly Val Gly			
355	360	365	
GTC AGC TCC ACA GCA TCC CGC CTG GGC AGC ATC CTG TCT CCC TAC TTC			1151
Val Ser Ser Thr Ala Ser Arg Leu Gly Ser Ile Leu Ser Pro Tyr Phe			
370	375	380	
GTT TAC CTT GGT GCC TAC GAC CGC TTC CTG CCC TAC ATT CTC ATG GGA			1199

Val Tyr Leu Gly Ala Tyr Asp Arg Phe Leu Pro Tyr Ile Leu Met Gly
 385 390 395
 AGT CTG ACC ATC CTG ACA GCC ATC CTC ACC TTG TTT CTC CCA GAG AGC 1247
 Ser Leu Thr Ile Leu Thr Ala Ile Leu Thr Leu Phe Leu Pro Glu Ser
 400 405 410 415
 TTC GGT ACC CCA CTC CCA GAC ACC ATT GAC CAG ATG CTA AGA GTC AAA 1295
 Phe Gly Thr Pro Leu Pro Asp Thr Ile Asp Gln Met Leu Arg Val Lys
 420 425 430
 GGA ATG AAA CAC AGA AAA ACT CCA AGT CAC ACA AGG ATG TTA AAG GAT 1343
 Gly Met Lys His Arg Lys Thr Pro Ser His Thr Arg Met Leu Lys Asp
 435 440 445
 GGT CAA GAA AGG CCC ACA ATC CTT AAA AGC ACA GCC TTC TAACATCGCT 1392
 Gly Gln Glu Arg Pro Thr Ile Leu Lys Ser Thr Ala Phe
 450 455 460
 TCCAGTAAGG GAGAAACTGA AGAGGAAAGA CTGTCTTGCC AGAAATGGCC AGCTTGTGCA 1452
 GACCGAGTCC TTCAGTGACA AAAGGCCTTT GCTGTTGTC CTCTTGACCT GTGTCTGACT 1512
 TGCTCCTGGA TGGGCACCCA CACTCAGAGG CTACATATGG CCC 1555

配列番号 : 5

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

CTAATACGAC TCACTATAGG GC 22

配列番号 : 6

配列の長さ : 21

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

TGTAGCGTGA AGACGACAGA A

21

配列番号： 7

配列の長さ： 22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

TCGAGCGGCC GCCCGGGCAG GT

22

配列番号： 8

配列の長さ： 22

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

AGGGCGTGGT GCGGAGGGCG GT

22

配列番号： 9

配列の長さ： 20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

CTTTGAGCA AGTTCAAGCCT

20

配列番号 : 10

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

AGAGGTGGCT TATGAGTATT TCTT

24

配列番号 : 11

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

CCAGGGTTTT CCCAGTCACG AC

22

配列番号 : 12

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配 列

TCACACAGGA AACAGCTATG AC

22

配列番号 : 13

配列の長さ : 24

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

GTGCTGTTGG GCTCCTTCAT TTCA

24

配列番号： 14

配列の長さ： 24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

AGCTGCATGA AGAGAAGGAC ACTG

24

配列番号： 15

配列の長さ： 24

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配 列

AGCATCCTGT CTCCCTACTT CGTT

24

【図面の簡単な説明】

【図 1】

OCTファミリータンパク質間のアミノ酸配列の比較を示す。図中のクローン名の頭の「h」はヒト由来を、「m」はマウス由来を、「r」はラット由来を示す。

【図 2】

OCTファミリータンパク質の疎水性プロットを示す。kyte&Doolittleの計算式による。Windowサイズは9アミノ酸である。

【図 3】

f1s631のノーザン解析の結果を示す電気泳動像である。

【図 4】

第5番染色体q領域由来のf1s631類似配列(5q Genome)と、f1s631配列の比較を示す。

【図5】

f1s631と631RTのアミノ酸配列の比較を示す。糖トランスポーターのコンセンサス配列に一致する配列を「+」で、ATP/GTP結合サイトのコンセンサス配列に一致する配列を「*」で示す。

【図6】

631RTのノーザン解析の結果を示す電気泳動像である。

【図7】

f1s631のTEAの吸収活性を示す。白丸は未処理の細胞、黒丸はf1s631を導入した細胞を示す。

【図8】

図7の実験系に対するコールドTEAの添加による影響を示す。図中の黒丸はf1s631を導入した細胞、白丸はインサートを含まないベクターを導入した細胞、白三角は黒丸の値から白丸の値を差し引いた、正味のf1s631による取り込み量を示す。

【図9】

f1s631におけるTEA吸収活性のTEA濃度依存性を示す。

【図10】

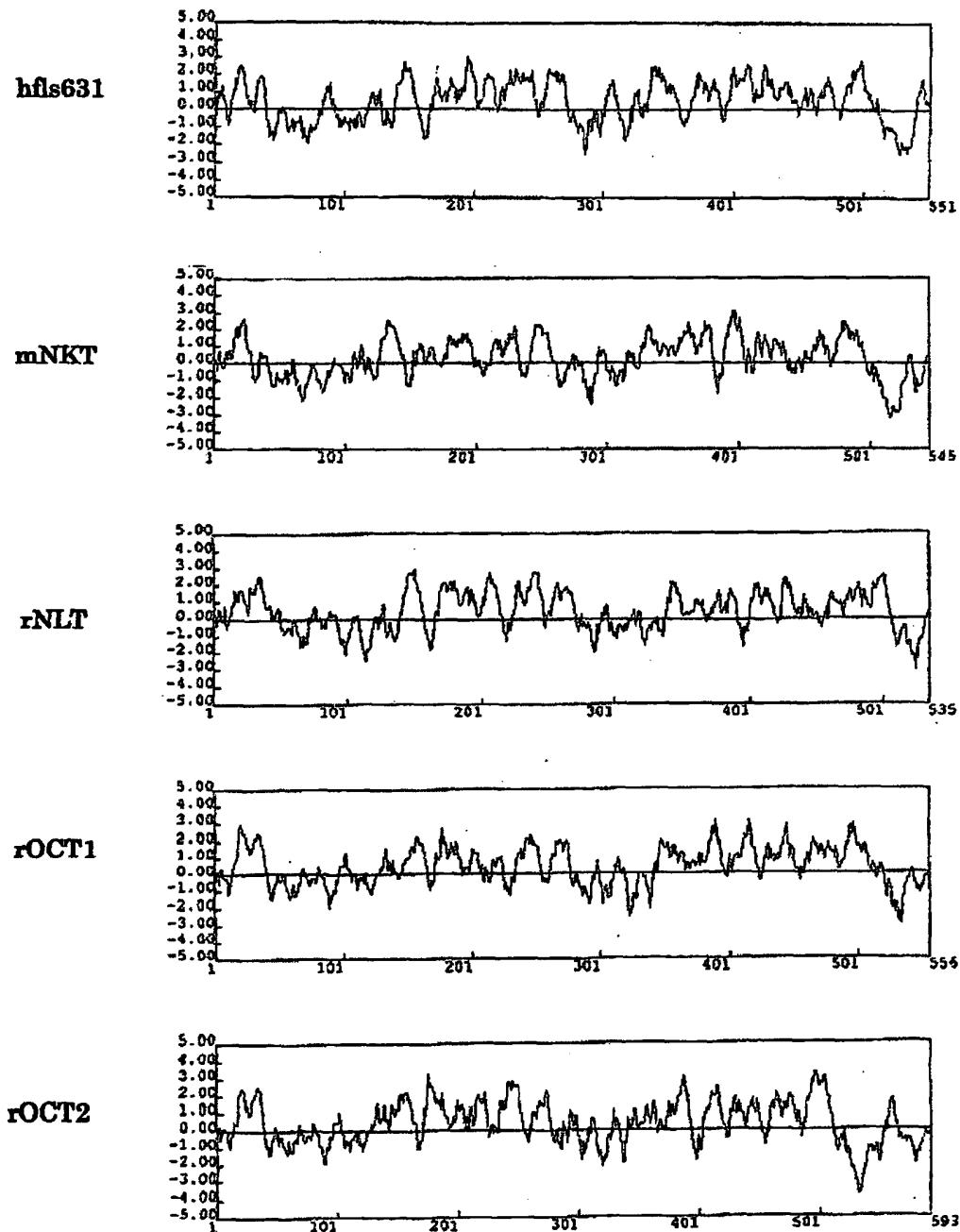
f1s631を導入した細胞におけるTEA以外の物質の吸収活性を示す図である。

【書類名】

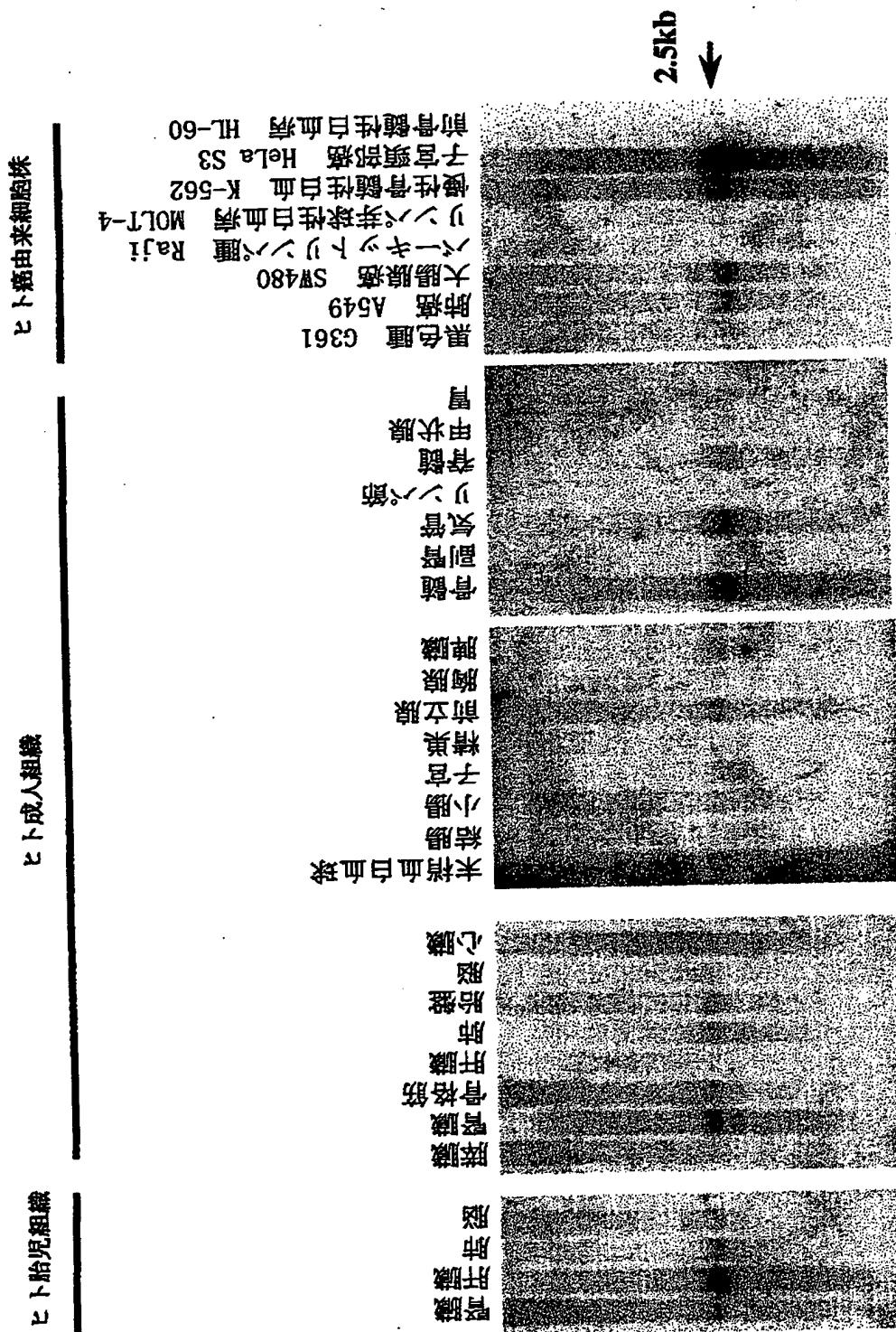
四面

【図1】

【図2】



【図3】



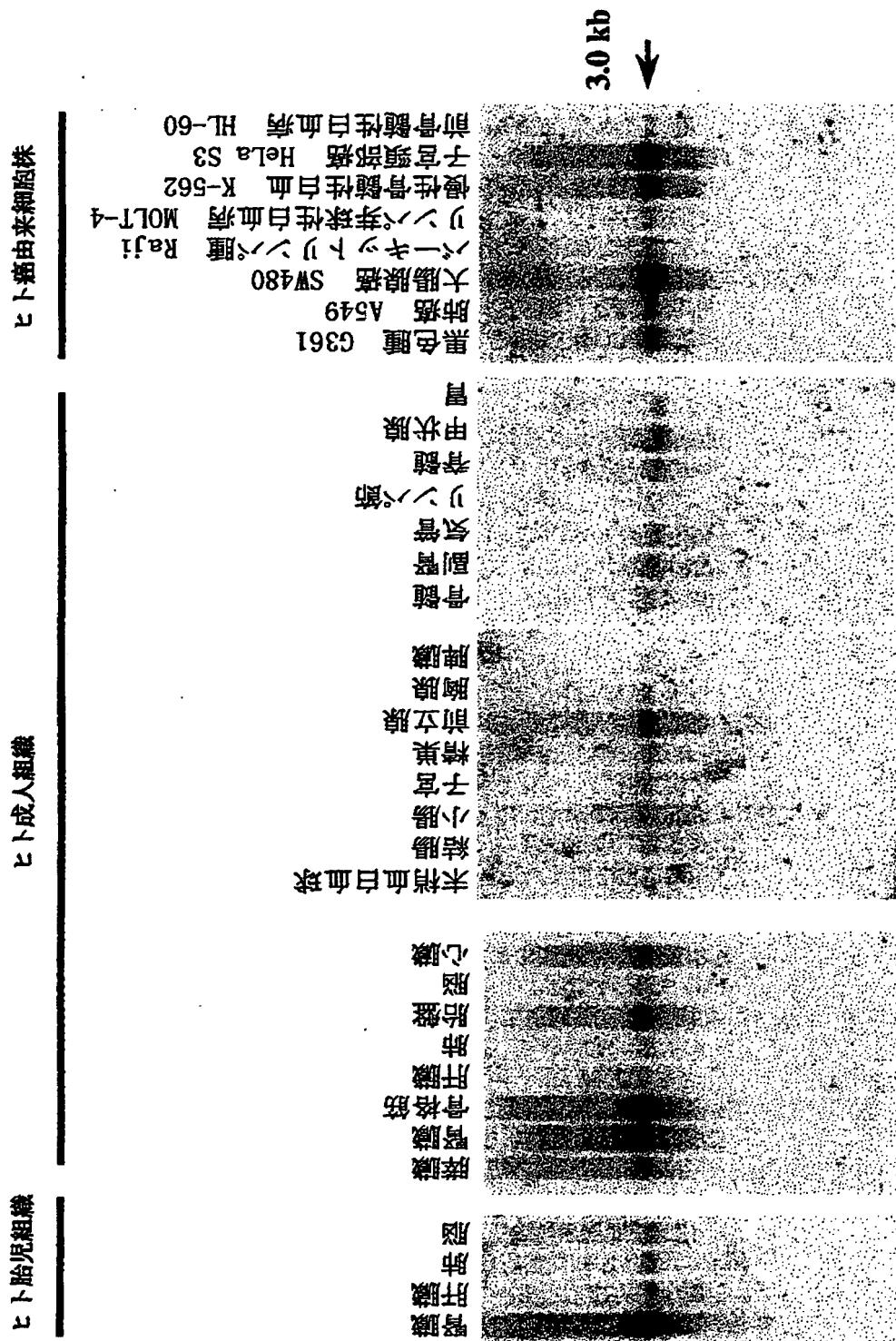
【図4】

	10	20	30	40	50	60
5q Genome	GGATGACCATATCACTGGGCTATTTGGGCTTCGCTTGATACTCCTAACTTGCATGGGG					
	X::::	::	:::::	::	::	::::
f1s631	GGATGCTGACCTCACTGGGTTACTTGTCTGGATGCTCCTAAATTACATGGAG					
	1200	1210	1220	1230	1240	1250
	70	80	90	100	110	120
5q Genome	ACATTTGTGAAC TGCTTCCCTTCAGCGATGGTGAAGTCCCAGCATATGTGTTGGCCT					
	:	::	:::::	:::	::	::::
f1s631	ATGCCTACCTGAAC TGTTCCCTCTGCCTTGATTGAAATTCCAGCTTACATTACAGCCT					
	1260	1270	1280	1290	1300	1310
	130	140	150	160	170	180
5q Genome	GGCTGCTGCTGCAATATTGCCCCGGCGTATTCCATGCCACTGCCCTTCCCTGGGTG					
	:::::	:::	:::::	:::	::	::::
f1s631	GGCTGCTATTGCGAACCGTCCCCAGGGCGTATATCATAGCTGCAGTACTGTTCTGGGAG					
	1320	1330	1340	1350	1360	1370
	190	200	210	220	230	240
5q Genome	GCAGTGTCTTCTCTTCATGCAGCTGGTACCCNNNGACTTGTATTATTGGCTACAGTCC					
	:	:::::	::::::	:::	::
f1s631	GAGGTGTGCTTCTCTTCATTCAACTGGTACCTGTGGATTATTACTTCTTATCCATTGGTC					
	1380	1390	1400	1410	1420	1430
	250	260	270	280	290	300
5q Genome	TGGTGTGGGGCAAGTTGGAGTCACGGCTGCCTTCCATGGTCTACGTGTACACAG					
	::::	:::	::::	::::	:::	::::
f1s631	TGGTCATGCTGGAAAATTGGGATCACCTCTGCTTCTCCATGCTGTATGTCTTCACTG					
	1440	1450	1460	1470	1480	1490
	310	320	330	340	350	360
5q Genome	CCGAGCTGTATCCCACAGTGGTGAGAACATGGGTGGGAGTCAGCTCCACAGCATCCC					
	::::	:::	::::	::::	::::	::::
f1s631	CTGAGCTCTACCCAACCCCTGGTCAGGAACATGGGGTGGGGTCACATCCACGGCCTCCA					
	1500	1510	1520	1530	1540	1550
	370	380	390	400		
5q Genome	GCCTGGGCAGCATCCTGCTCCCTACTTCGTTACCTGGT					
	::::	:::	:::::	:::::	X	:::
f1s631	GAGTGGGCAGCATCATTGGCCCCCTACTTGTGTTACCTCGGT					
	1560	1570	1580	1590		

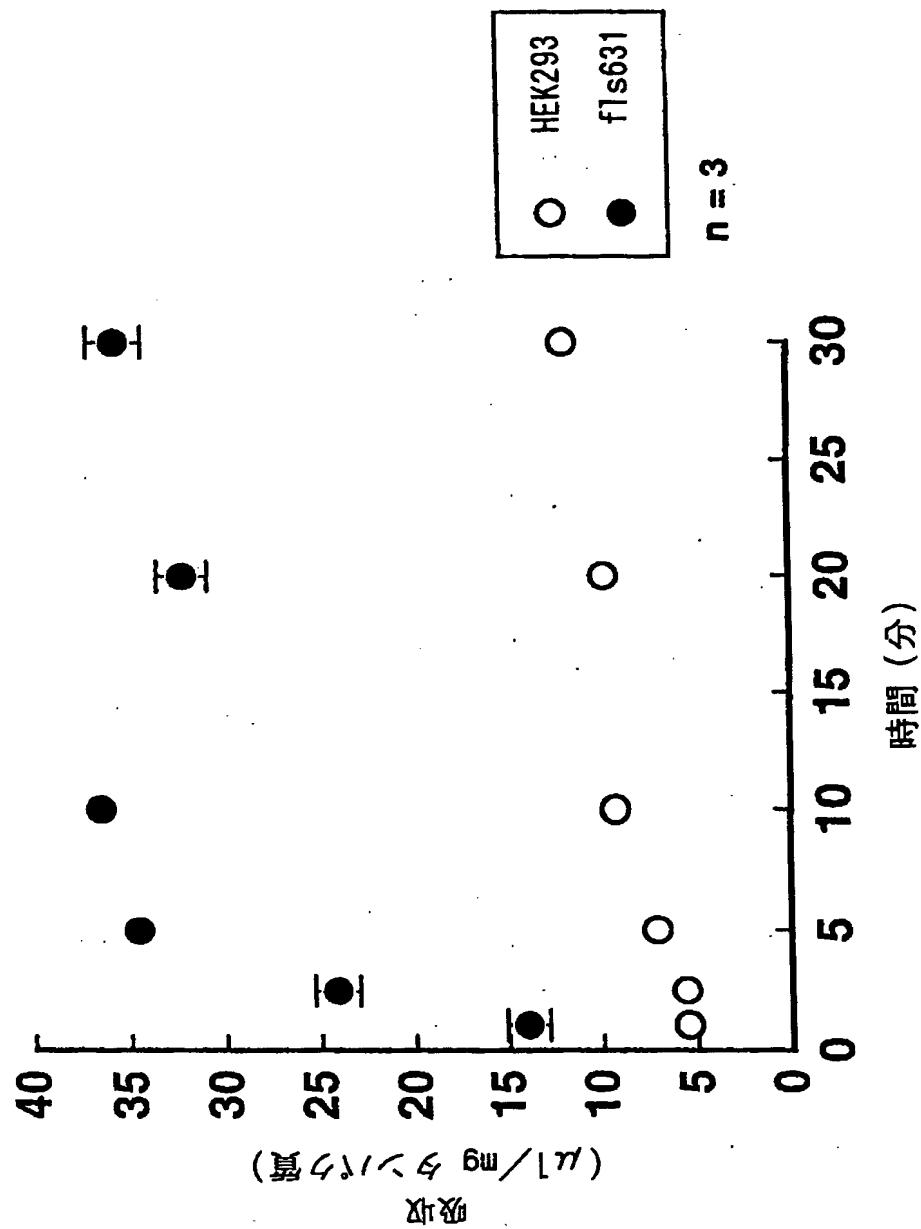
【図5】

	10	20	30	40	50
fls631	MRDYDEVIAF	LGEWGPQRL	IFFLLSASII	PNGFNGMSVV	FLAGTPEHRC
631RT					
	60	70	80	90	100
fls631	RVPDAANLSS	AWRNNNSVPLR	LRDGREVPHS	CSRYRLATIA	NPSALGU
631RT					
	110	120	130	140	150
fls631	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
631RT	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]
	160	170	180	190	200
fls631	[REDACTED]EV	[REDACTED]	[REDACTED]AV	[REDACTED]	ISW
631RT	[REDACTED]IS	[REDACTED]	[REDACTED]V	[REDACTED]	KNP
	210	220	230	240	250
fls631	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	V
631RT	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	P
	260	270	280	290	300
fls631	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	R
631RT	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	E
	310	318	328	338	348
fls631	[REDACTED]A	[REDACTED]V	[REDACTED]KAF	[REDACTED]	ALM
631RT	[REDACTED]ANGV	[REDACTED]T	[REDACTED]SHN	[REDACTED]	RMV
	358	368	378	388	398
fls631	[REDACTED]A	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	W
631RT	[REDACTED]T	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	Y
	408	418	428	438	448
fls631	[REDACTED]AV	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	S
631RT	[REDACTED]S	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	W
	458	468	478	488	498
fls631	[REDACTED]E	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	P
631RT	[REDACTED]V	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	I
	508	518	528	535	545
fls631	[REDACTED]G	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	V
631RT	[REDACTED]T	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	I

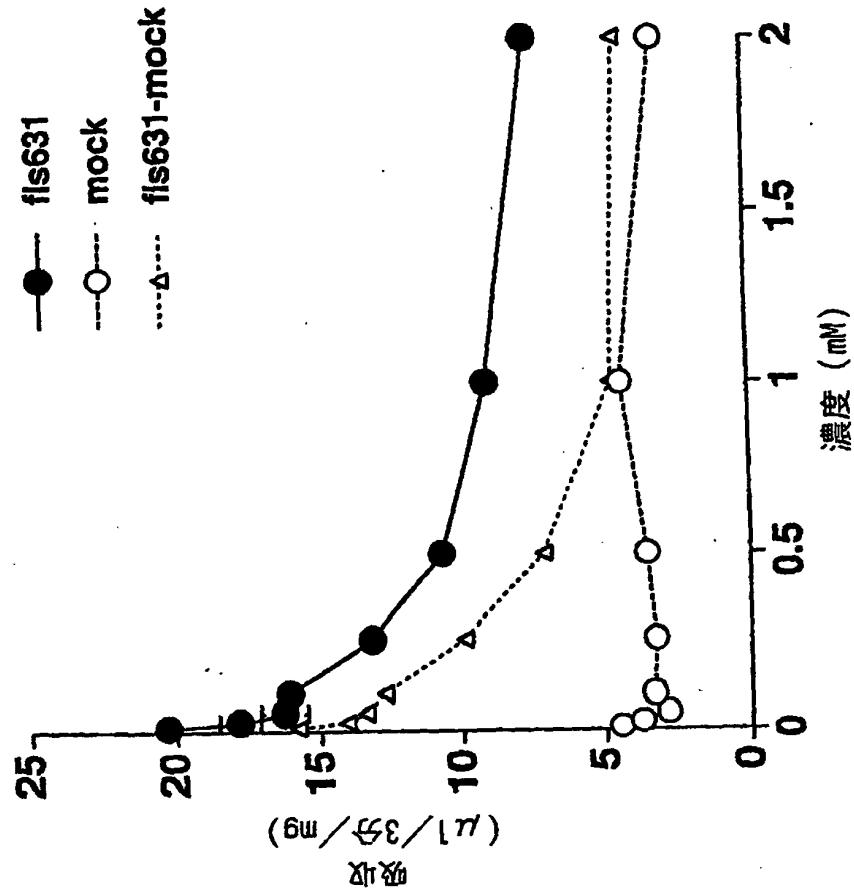
【図6】



【図7】

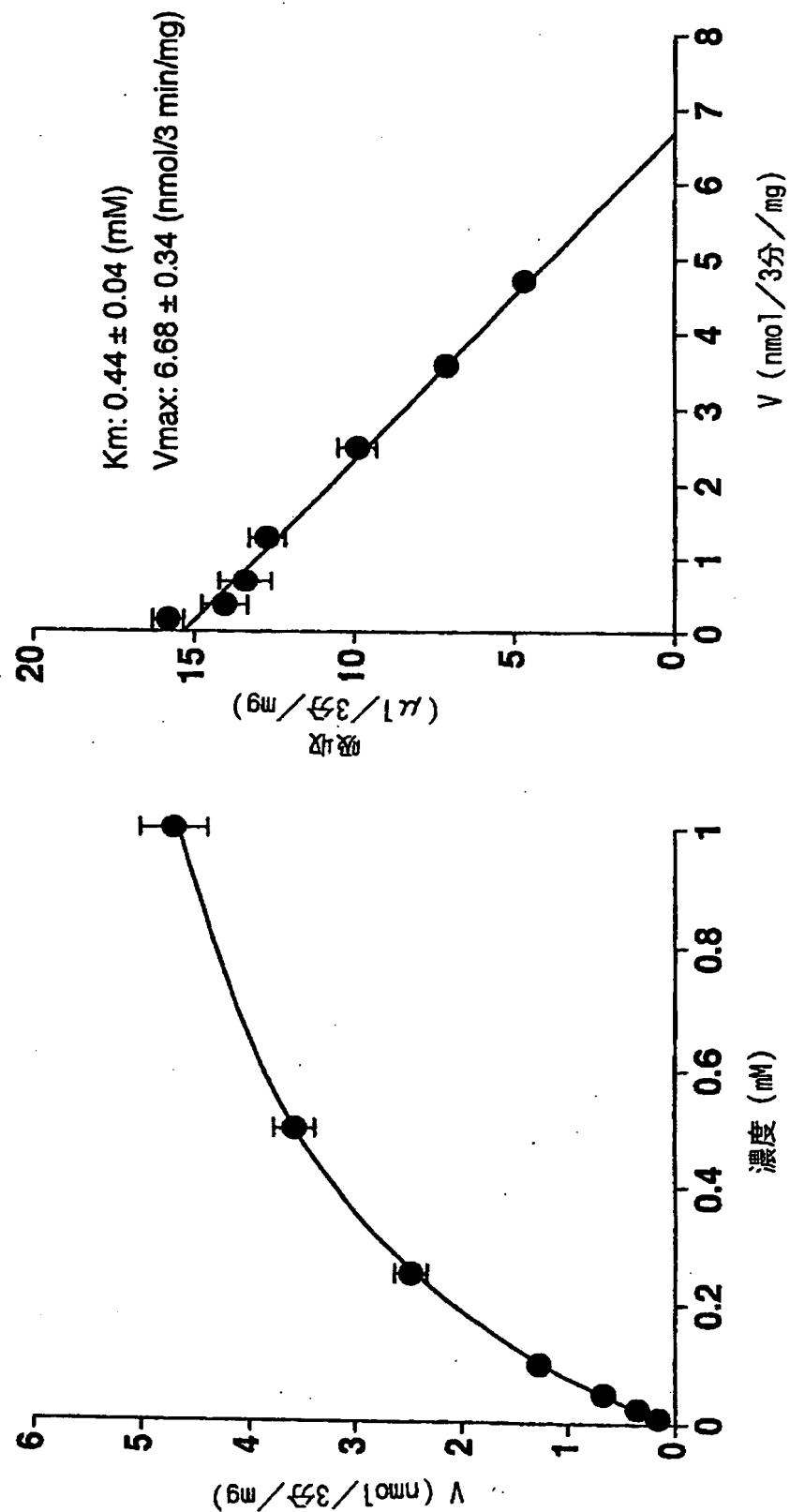


【図8】

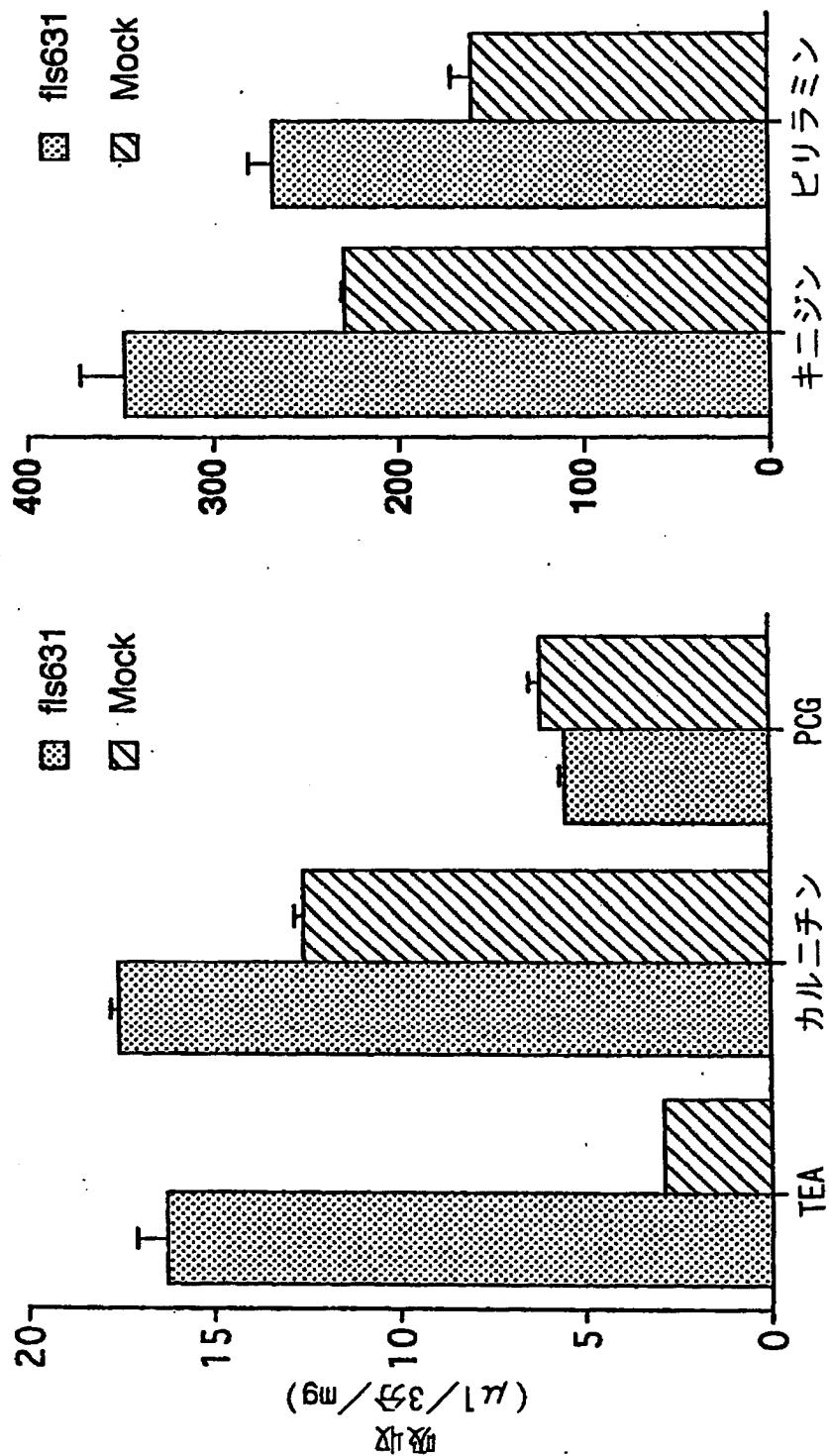


特平 9-260972

【図9】



【図10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なトランスポーターを提供することを課題とする。

【解決手段】 胎児遺伝子 (fetal gene) ライブラリーの、ランダムシークエンシングによるスクリーニングを行い、既知の有機力チオントランスポーターファミリータンパクと有意な相同意を示す未知の遺伝子の存在を見いだした。この遺伝子のクローニングを行い、その構造の解析を行った結果、該遺伝子が全体に渡り有機力チオントランスポーターファミリータンパク質と非常に高い相同意を有する新規なタンパク質をコードしていることを見いだした。さらに、単離した遺伝子がコードするタンパク質のトランスポーター活性を検討した結果、該タンパク質が種々の有機力チオンのトランスポーターとして機能することを見いだした。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

＜認定情報・付加情報＞

【特許出願人】

【識別番号】 596102791
【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 153 番地 2
【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階
【氏名又は名称】 清水国際特許事務所
清水 初志

出願人履歴情報

識別番号 [596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2
氏 名 株式会社中外分子医学研究所